

Daño inducido en el ADN plasmidial por la radiación mixta de neutrones térmicos + rayos gamma en presencia y ausencia de capturador de radicales libres

Maritza Rodríguez-Gual, Félix Mas-Milian,* Andreia Gouveia** y Airton Deppman.*

Instituto Superior de Tecnologías y Ciencias Aplicadas, Quinta de Los Molinos, Avenida Salvador Allende y Luaces, Código Postal 10300, Ciudad de La Habana, Cuba. Correos electrónicos: mrgual@instec.cu; mrgual@yahoo.es. *Instituto de Física, Universidad de São Paulo, Rua do Matao, trav R., no. 187, Cidade Universitaria, Butanta, CEP: 05508-900, Sao Paulo, Brazil. **Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, Cidade Universitaria, Butanta, São Paulo, Brazil.

Recibido: 24 de mayo de 2010.

Aceptado: 3 de noviembre de 2010.

Palabras clave: roturas de simple y doble cadena, ADN, capturador de radicales libres, neutrones térmicos, radiación gamma.
Key words: single and double strand breaks, DNA, free radical scavengers, thermal neutrons, gamma radiation.

RESUMEN. En este trabajo se cuantifica por primera vez el daño en ADN plasmidial inducido por la radiación mixta de neutrones térmicos + rayos gamma. Para el estudio fue utilizado el plasmidio pBs KS+ de 2 961 pb en disolución acuosa a 88 ng/μL a concentraciones de 0, 2 y 20 mmol/L de glicerina que actúa como un capturador de radicales libres. Este plasmidio cambia su forma superenrollada para circular cuando es producida una rotura simple en su cadena y adquiere una forma lineal cuando se produce una rotura doble en su cadena. Cuantificando las fracciones que se producen de cada una de estas formas es posible estimar el efecto de la radiación en el ADN. Las irradiaciones fueron realizadas en el canal radial # 3 del reactor de investigaciones IEA-R1 del Instituto de Pesquisas Energéticas y Nucleares de São Paulo, Brasil. Las formas del ADN fueron separadas mediante la electroforesis en gel de agarosa. En la cuantificación se utilizó el programa GelAnalis. Las fracciones de ADN en sus diferentes formas fueron graficadas en función de la dosis y ajustadas a funciones exponenciales y lineares para obtener las probabilidades de roturas simples y dobles en la cadena de ADN normalizadas por dosis y por masa molecular. Los resultados evidenciaron la acción protectora del capturador de radicales libres contra el daño inducido por la radiación, lo cual corrobora resultados anteriores obtenidos con otras radiaciones ionizantes. Los rendimientos de SSB y DSB serán de interés para la validación de diferentes modelos que intentan reproducir los resultados experimentales.

ABSTRACT. In this work is quantified the damage in DNA plasmid induced by mixed radiation (thermal neutron and gamma rays) for first time. For the study was used the pBs KS+ plasmid of 2961 bp in aqueous solution of the 88 ng/μL with 0, 2 and 20 mmol/L of glycerol which acts as a free radicals scavenger. This plasmid changes its form of supercoiled to circular when a simple strand break is produced, and passes to a linear form when a double strand break is produced in the chain. Quantifying the fractions that exist in each of these forms is possible to estimate the effect of radiation on DNA. The irradiations were carried out in the radial channel # 3 at IEA-R1 research reactor of the Instituto de Pesquisas Energéticas y Nucleares in Sao Paulo, Brazil. DNA forms were separated by agarose gel electrophoresis. For quantification the program GelAnalis was used. The values of the fractions of DNA in various forms were plotted as a function of dose and fitted to exponential and linear functions to obtaining the probabilities of simple and double strand breaks normalized by dose and molecular mass. The results showed the protective action of free radical scavenger against damage induced for radiation which corroborates the previous results found with other ionizing radiations. Yields of SSB and DSB will be of interest for the validation of the different models that attempt to reproduce the experimental results.

INTRODUCCIÓN

Actualmente diferentes grupos de investigadores en el mundo están llevando a cabo estudios con el objetivo de entender mejor la naturaleza del daño causado por la radiación ionizante en el ADN.¹⁻⁸ Uno de los objetivos es dilucidar cómo este complejo proceso es realizado y de esa forma, evitar o disminuir los efectos causados en células sanas y aumentar su efecto sobre células cancerígenas. La mayoría de los trabajos estudian el efecto de los rayos X y gamma, así como electrones, por el fácil

acceso a los aceleradores lineales e irradiadores dentro de hospitales y centros de investigación. Son muy pocos los trabajos que estudian los efectos de las partículas cargadas o neutras como protones y neutrones debido a la necesidad de poseer instalaciones muy costosas que sean capaces de generarlas, además de la complejidad que trae realizar su irradiación.

Por otra parte, cuando se comparan los resultados experimentales obtenidos por varios laboratorios del mundo, se observan diferencias en órdenes de magnitud

debido a factores tales como: tipo de molécula y concentración de ADN, grado de pureza, capturador de radicales libres y metodología de análisis. Por esto, fue necesario desarrollar una metodología experimental que permitiera hacer un estudio sistemático y con buena precisión de la interacción de la radiación con la molécula ADN. De ahí, surgió el proyecto internacional de la Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, "Interação de radiação com o DNA", Proyecto FAPESP 097555-0, 2002-2006. Este trabajo de investigación fue elaborado en el marco de ese proyecto y en él tomó parte un grupo multidisciplinario de especialistas de Cuba y Brasil. Dicho proyecto consistió en estudiar daños inducidos por diferentes tipos de radiación (rayos gamma, protones y neutrones) manteniendo el mismo tipo de molécula, el mismo capturador de radicales libres y la misma metodología de análisis (protocolo de purificación y programa de cuantificación del ADN).

En muchos trabajos, se utiliza el ADN de plasmidios por ser estos de menor tamaño y más fáciles de analizar utilizando técnicas poco costosas como el gel de electroforesis.¹⁻²³

Los plasmidios están constituidos por cadenas simples y circulares de ADN en el orden de los miles de pares de bases. Estos pueden ser encontrados en formas diferentes en función del tipo de rotura que posea su cadena. Las roturas pueden suceder en solo una parte de la cadena lo que es denominado roturas simples o SSB (siglas en inglés, Single Strand Breaks), o en ambas partes de la cadena, roturas dobles o DSB (siglas en inglés, Double Strand Breaks).²⁴ Con respecto a su forma: cuando no exista rotura, el ADN estará en su forma superenrollada (S); cuando experimente una rotura en una de sus pares de bases, pasará a su forma circular relajada (C); cuando la cadena toda sea cortada, pasará a la forma lineal (L).²⁵ Estas diferencias permiten estudiar los procesos de roturas simples y dobles inducidas en la molécula de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa, método muy sensible, simple, rápido y de bajo costo que permite separar, identificar y purificar moléculas de ADN.

Se han reportado estudios previos *in vivo* e *in vitro* con neutrones de fisión⁹⁻¹³ y neutrones rápidos¹⁴⁻¹⁹ y en presencia de capturador de radicales libres.⁹⁻¹⁹ El aporte del presente trabajo con respecto a lo que se ha hecho anteriormente es que en ausencia de capturador de radicales libres no se habían realizado irradiaciones *in vitro*. En este trabajo son presentados resultados de irradiaciones de ADN plasmidial en disolución acuosa utilizando un campo mixto de neutrones térmicos y rayos gamma proveniente del Reactor de Investigaciones Brasileño IEA-R1. EL principal objetivo fue ofrecer datos inéditos sobre el efecto de un flujo de neutrones de energía predominantemente térmica en el ADN plasmidial pBS KS+ y unirlos a otros resultados de irradiaciones con rayos gamma y protones que utilizaron la misma metodología de análisis.^{26,27} Dichos datos experimentales formarán un banco de datos útiles para modelar los procesos de daño en ADN. Por tal motivo, es que hasta el presente estos experimentos se continúan realizando. La importancia de este estudio radica en que sus resultados complementarán los existentes en la validación de los diferentes estudios teóricos que tratan de modelar el daño producido en el ADN por los diversos tipos de radiaciones ionizantes.²⁸⁻³³ Mientras más datos sean adquiridos, mayores serán la precisión y exactitud de los resultados experimentales.

El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar el daño inducido en ADN plasmidial inducido por la radiación mixta de neutrones térmicos + rayos gamma en presencia y ausencia de capturador de radicales libres.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de ADN

Se utilizaron moléculas de ADN del plasmidio Bluescript II phagemid de Stratagene® (pBs KS+) de 2 961 pares de bases. El ADN fue aislado de la bacteria *Echerichia coli* DH5α. La concentración de ADN fue determinada midiendo la absorbancia a 260 nm, la que resultó de 88 ng/μL. El ADN fue purificado por medio de centrifugación en gradiente de cloruro de cesio. El protocolo de purificación que constituyó una parte de la nueva metodología desarrollada formó parte de otro trabajo.²⁷

El plasmidio se encontraba en forma superenrollada en un 98 %. Fueron usados en la irradiación 25 μL de la muestra en un tubo de polipropileno (Eppendorf) de 0,5 mL.

Irradiación

El reactor nuclear de investigaciones IEA-R1 del Instituto de Investigaciones Energéticas e Nucleares de Brasil fue la fuente de neutrones utilizada para la irradiación del ADN, operado a 2 MW. La tasa de dosis de radiación producida en las moléculas de ADN en la posición de irradiación fue determinada con un par de detectores termoluminiscentes (TLDs) basados en LiF: uno sensible a los neutrones (TLD-600) y otro de baja sensibilidad a los neutrones (TLD-700). Como capturador de radicales •OH generados durante la irradiación en medio acuoso, se empleó, la glicerina (Invitrogen, CA, USA) de peso molecular 92,10 g/mol. Para analizar el efecto indirecto de los radicales libres, fueron preparadas tres tipos de muestras con iguales concentraciones de ADN y con glicerina a concentraciones de 0, 2 e 20 mmol/L. Cada una de ellas fue dividida e irradiada a dosis diferentes y controladas en el tiempo una vez conocida la tasa de dosis.

Electroforesis en gel de agarosa

Una vez que cada ciclo de irradiación era terminado, las muestras del mismo tipo fueron analizadas mediante electroforesis en gel de agarosa.³⁴ Cada muestra de ADN irradiada, se encontraba en diferentes formas (S, C y L) debido a las roturas causadas por la radiación. Estas formas fueron separadas utilizando electroforesis en gel de agarosa. Los geles fueron preparados con 0,7 % de agarosa³⁴ a pH 8 y teñidos previamente con el colorante fluorescente bromuro de etilo para la visualización de las bandas de ADN mediante luz UV. La corrida se realizó en disolución estabilizadora TBE 0,5X a 5 V/cm durante 2 h. En ese tiempo, el gel puede separar de 450 a 800 ng de ADN en sus formas S, C y L. Antes de las corridas a cada muestra irradiada se le adicionaron 10 μL de agua ultrapura y 3 μL de Stop Mix con bromofenol azul al 0,5 %, para ajustar la concentración del ADN y permitir su localización en el gel durante la corrida, respectivamente. En un mismo gel de agarosa fueron corridas todas las muestras del mismo tipo sometidas a diferentes dosis de radiación en orden creciente de izquierda a derecha. Una vez separadas las bandas de ADN, cada gel fue fotografiado en el sistema EAGLE EYE (Stratagene, San Diego, CA, USA), usando una cámara de video CCD acoplada a una computadora. Las diferentes formas de ADN aparecen como bandas claras (fluorescentes) en presencia de la luz UV. El número de integraciones para cada foto fue controlado, evitando la saturación del CCD del sistema. Las imágenes fueron guardadas en formato BMP para no perder resolución y no afectar la cuantificación del ADN.

Análisis cuantitativo

La cuantificación de la cantidad de ADN en cada banda del gel fue realizada con el programa procesador de imágenes GeLAnalis,²⁶ que fue específicamente implementado con este propósito. Este programa formó parte de la nueva metodología desarrollada en el macroproyecto de investigación internacional en el que se encontraba insertado este trabajo de investigación. A cada gel le fue eliminado el fondo y cuantificadas todas las bandas en unidades de luminosidad, siguiendo una metodología optimizada por el grupo.²⁶ La luminosidad de la forma de ADN superenrollado fue calculada multiplicando por un factor de 1,7 para considerar la deficiencia de adherencia del bromuro de etilo en el ADN superenrollado^{14,16,23} en comparación con las formas circular abierta y lineal. Los resultados fueron guardados en formato TXT para su procesamiento mediante el programa Excel para su análisis posterior.

Determinación de los rendimientos de roturas en la cadena de ADN

La magnitud del daño inducido por la radiación ionizante se trató en términos de probabilidad o rendimiento para la formación de roturas en la cadena de ADN (valor G). El modelo previamente descrito por Cowan y otros (1987)²⁵ fue usado para determinar el rendimiento de formación de SSB y DSB inducidas por la radiación ionizante.

Los resultados de la cuantificación en forma de luminosidad fueron normalizados para las fracciones de S, C y L. Con estos resultados se construyeron gráficos de las fracciones de fracciones S, C y L en función de la dosis para los tres tipos de muestras con diferentes cantidades de glicerina (0, 2 y 20 mmol/L). Para la determinación del rendimiento de roturas simples y dobles en la cadena de ADN la curva de fracción de superenrollado fue ajustada a una función exponencial

$$S = S_0 \exp(-\lambda_{SSB} \cdot D)$$

y la fracción lineal a una recta

$$L = a + \lambda_{DSB} \cdot D$$

siguiendo la metodología aceptada por la mayoría de los trabajos científicos.^{14,16,20-23} La unidad de λ_{SSB} y λ_{DSB} es el Gray⁻¹ y representa el valor de la constante de la exponencial y de la pendiente de la recta, respectivamente. Para los ajustes en todos los casos, se utilizó el método de los mínimos cuadrados y el programa ORIGIN V. 6.0 (2006). Seguidamente, estos resultados fueron normalizados por la masa molecular del ADN con el objetivo de reportar la probabilidad de roturas simples y dobles por Gy⁻¹ · Da⁻¹. Esto es útil al comparar con otros trabajos que utilizan ADN con tamaños diferentes. Los valores normalizados fueron calculados como:^{14,16,20-23}

$$G_{SSB} \left[Gy^{-1} \cdot Da^{-1} \right] = \frac{\lambda_{SSB} \left[I / Gy \right]}{\#pb \cdot 650 \left[Da \right]} \quad (1)$$

$$G_{DSB} \left[Gy^{-1} \cdot Da^{-1} \right] = \frac{\lambda_{DSB} \left[I / Gy \right]}{\#pb \cdot 650 \left[Da \right]} \quad (2)$$

donde:

#pb número de pares de bases de ADN, que en este estudio fue de 2 961 pb.

El valor de 650 utilizado resultó de asumir que la masa molecular de 1 pb de ADN es igual a 650 Da.

Los valores de G_{SSB} y G_{DSB} fueron calculados para los tres tipos de muestras que poseían diferentes cantidades de glicerina. Los valores resultantes de la irradiación con un flujo de neutrones predominantemente de energías térmicas constituyeron el principal resultado esperado de este trabajo.

Los resultados fueron sometidos a un análisis estadístico para estudiar la correlación entre ellos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron las fotografías de los geles corridos para las muestras de ADN irradiadas en ausencia (0) y presencia de 2 y 20 mmol/L de glicerina Figura 1 (A, B y C). Fue posible notar en algunos casos Figura 1 (A y B) que a partir del octavo o sexto carril, la dosis de radiación causa múltiples DSB en el ADN lo cual lo fragmenta tanto que da lugar a la desaparición de las bandas de la fotografía.

Se muestran los resultados normalizados de la cuantificación para fracciones de ADN para cada una de las tres muestras analizadas Figura 2 (A, B y C). Cada punto representa la fracción media $\pm 5\%$ de desviación típica. El 5% de desviación típica, es obtenido por la suma de los errores deterministas: en los análisis de cuantificación de las fracciones (1%), las tres repeticiones de las irradiaciones para la misma dosis (1%) y los errores estocásticos de: pipeteo de las muestras de ADN (1%) y del bromuro de etilo (1%), así como del pesado de la agarosa (1%). Teniendo en cuenta que los errores (desviación típica) de las repeticiones de las irradiaciones para un mismo valor de dosis, fueron menores del 10%, se soslayó el empleo de réplicas para cada dosis de radiación en aras de ganar tiempo y tener una mayor diversidad de datos.

Fue posible apreciar que se produce una conversión dependiente de la dosis, de la molécula superenrollada (S) no dañada, hacia la forma circular con el aumento de las roturas simples (S→C) y que con el incremento de la dosis la transición que aumenta es la de la circular para lineal (C→L), precisamente por el aumento de las roturas dobles (Figuras 1 y 2).

La fracción de ADN superenrollado para los tres tipos de muestras estudiadas, están ajustados a ecuaciones exponenciales (Fig. 3). De las curvas fue posible determinar los valores de λ_{SSB} que representan la probabilidad de inducir roturas simples en la cadena de ADN por unidad de dosis para el plasmidio estudiado. A partir de los λ_{SSB} fueron calculados los G_{SSB} (Tabla 1).

Al mismo tiempo, se realizó el ajuste a ecuaciones lineales de la fracción L de ADN (Fig. 4). La pendiente λ_{DSB} representa la probabilidad de producción de roturas dobles en función de la dosis para el tipo pBs KS+ irradiado con un flujo de neutrones predominantemente de energías térmicas. A partir de los λ_{DSB} fueron calculados los G_{DSB} (Tabla 2).

En todos los ajustes (Figuras 3 y 4), el coeficiente de correlación (R) resultó estar próximo a 1, lo que indicó la existencia de una fuerte correlación entre las variables x e y . Dado que $p < 0,002$, el ajuste por regresión simple tuvo un nivel de confianza del 99%. El error del ajuste fue menor del 5% (Tablas 1 y 2).

Se observó que a medida que aumentaba la concentración del captador de radicales libres, los rendimientos de roturas simples (G_{SSB}) y dobles (G_{DSB}), disminuían. Diferentes estudios han reportado la ocurrencia del mismo efecto con otros tipos de radiación ionizante.^{10,11,14,16,20-23} Esto evidencia el carácter indirecto causado por la radiólisis del agua durante la irradiación con un flujo mixto de neutrones

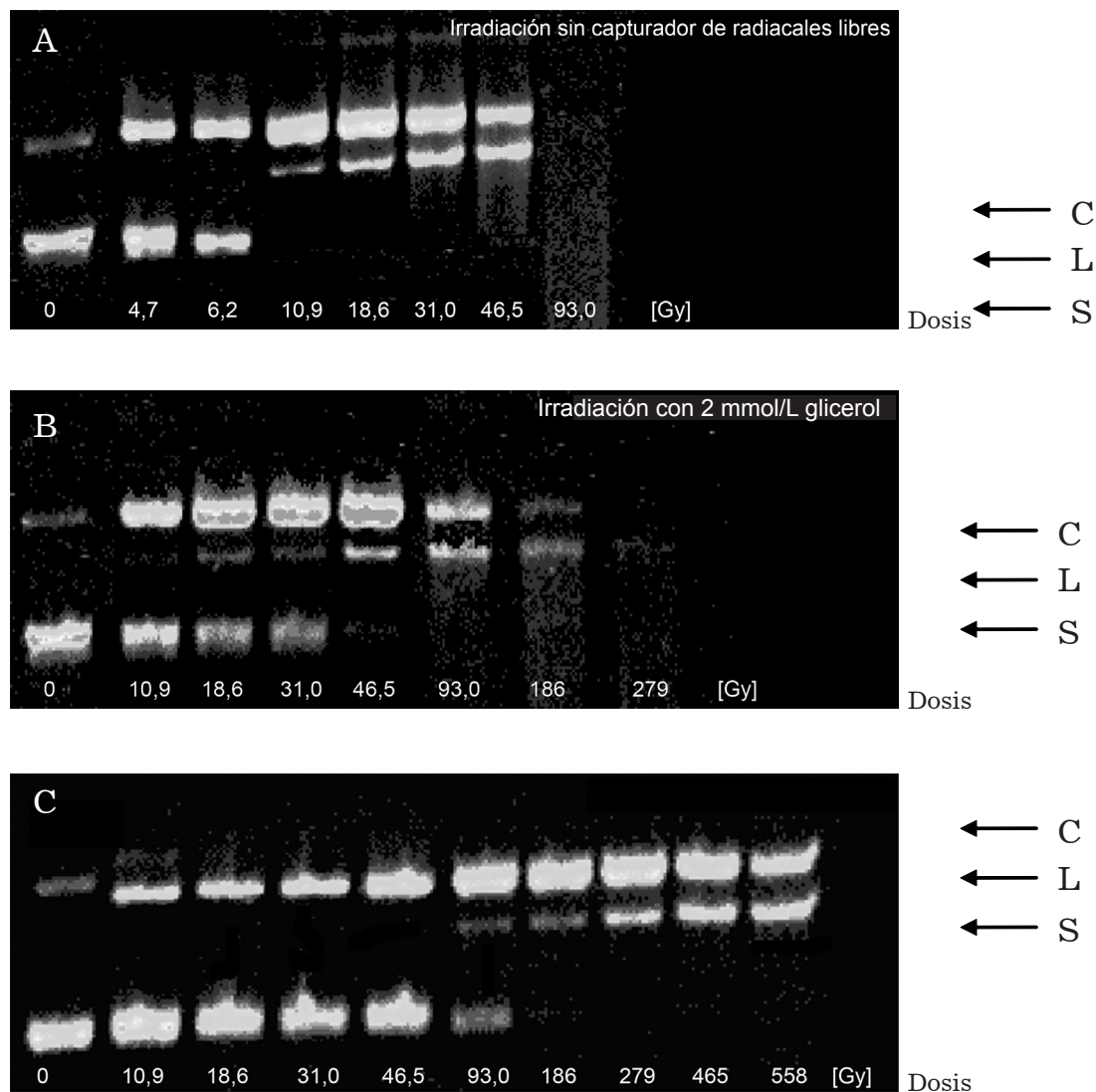


Fig. 1. Imágenes de las fotografías de los gels y resultados de su cuantificación en las muestras con 88 ng/μL de disolución de ADN para 0, 2 y 20 mmol/L de glicerina respectivamente (A, B y C) irradiadas con la radiación mixta de neutrones térmicos + rayos gamma. Las bandas claras representan las diferentes formas, circular (C), lineal (L) y superenrollada (S) en que es separada la molécula de ADN para cada dosis de radiación aplicada.

térmicos + rayos gamma (Figuras 3 y 4) (Tablas 1 y 2). El hecho de que el daño disminuya se explica si se considera que los radicales $\cdot\text{OH}$ generados durante la radiólisis del agua, tienen menos probabilidades de dañar el ADN si se aumenta la concentración de capturadores de radicales. Esto explica la disminución de G_{SSB} y G_{DSB} .

CONCLUSIONES

Este trabajo evidenció y cuantificó cómo el rendimiento de roturas en la cadena de ADN disminuye con el aumento de la concentración del captador de radicales libres, glicerina, como era de esperar en la irradiación en disolución acuosa. Al aumentar la tasa de reacción radical-captador, disminuye la tasa de reacción radical-ADN y por lo tanto, la cantidad de moléculas con daños. Los resultados aquí reportados, junto con otros encontrados para irradiaciones con rayos gamma y protones, son de gran utilidad para la validación de modelos estadísticos de daño por radiación. Este trabajo también representa el primer estudio *in vitro* de cuantificación del daño inducido en la molécula de ADN en ausencia de captador de radicales libres por un flujo mixto de neutrones térmicos + rayos gamma proveniente de un reactor nuclear.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero recibido por el Programa de Doctorado Cooperativo entre el Instituto de Física Teórica de Trieste (ICTP) y el Consejo Latinoamericano de Física (CLAF) y la Fundação de Amparo á Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Friedland W, Dingfelder M and Jacob P. Calculated DNA double-strand break and fragmentation yields after irradiation with He ions, *Radiation Physics and Chemistry*. 2005; February 72(2-3):279-286.
2. Edel S, Terrissol M, Peudon A, Kummerle E and Pomplun E. Computer simulation of strand break yields in plasmid pBR322: DNA damage following ^{125}I decay, *Radiat Prot Dosimetry*. 2006; 122:136-140.
3. Purkayastha S, Milligan JR and Bernhard WA. On the chemical yield of base lesions, strand breaks, and clustered damage generated in plasmid DNA by the direct effect of X rays. *Radiat Res*. 2007;168:357-366.
4. Hunniford CA, Timson DJ, Davies RJ and McCullough R W. Damage to plasmid DNA induced by low energy carbon ions, *Phys Med Biol*. 2007;52:3729-3740.
5. Akamatsu K. A Novel Methodology for Characterizing Strand-break Termini and Damaged Bases in Plasmid DNA Exposed to Ionizing Radiation, *Analytical Biochemistry*. 2007;362(2):229-235.

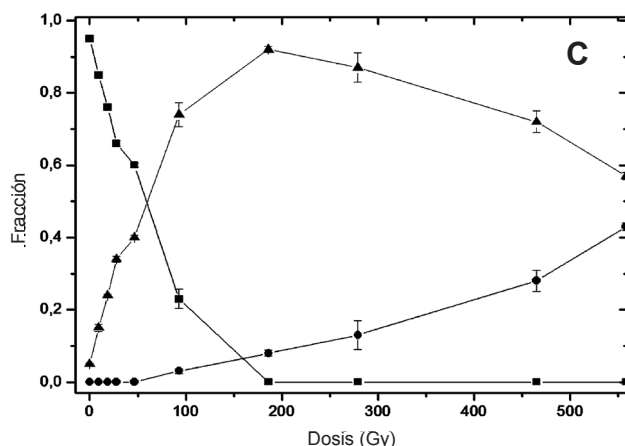
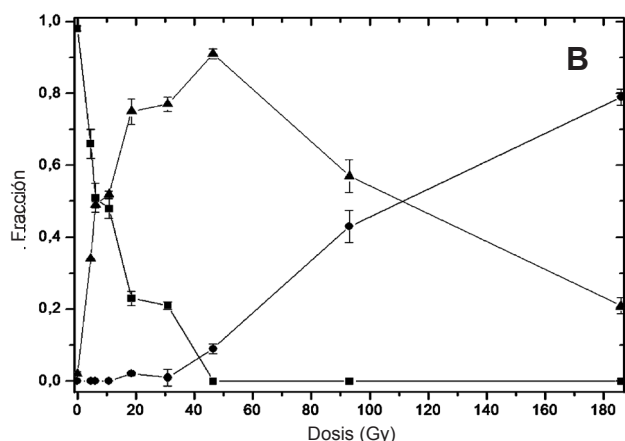
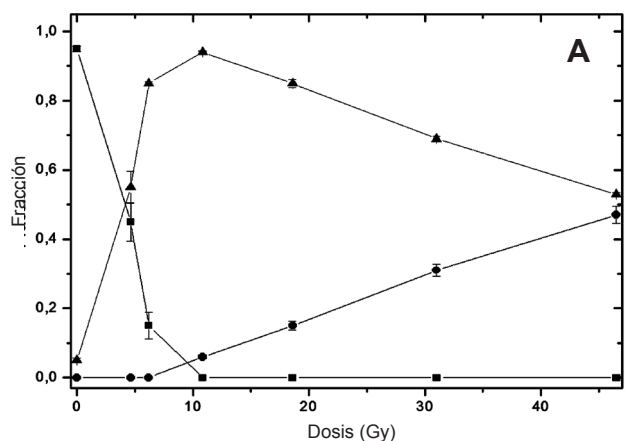


Fig. 2. Resultados de la cuantificación de los geles de las muestras con 88 ng/μL de disolución de ADN para 0, 2 y 20 mmol/L de glicerina respectivamente (A, B y C) irradiadas con la radiación mixta de neutrones térmicos + rayos gamma. ■ Superenrollada ● Lineal ▲ Circular.

Tabla 1. λ_{SSB} y G_{SSB} para la muestra de ADN de 88 ng/μL en función de la concentración de captador de radicales libres irradiada con la radiación mixta de neutrones térmicos + rayos gamma y resultados del ajuste de los porcentajes de la forma superenrollada en función de la dosis.

$C_{Glicerina}$ (mmol/L)	λ_{SSB} (Gy ⁻¹)	G_{SSB} (Gy · Da) ⁻¹	Error (ε)	R ²	N
0	0,247(0,022)	1,28E-07(1,19E-08)	0,022	0,990	7
2	0,062(0,111)	3,25E-08(8,52E-10)	0,011	0,959	9
20	0,013(0,001)	7,25E-09(2,49E-10)	0,001	0,986	8

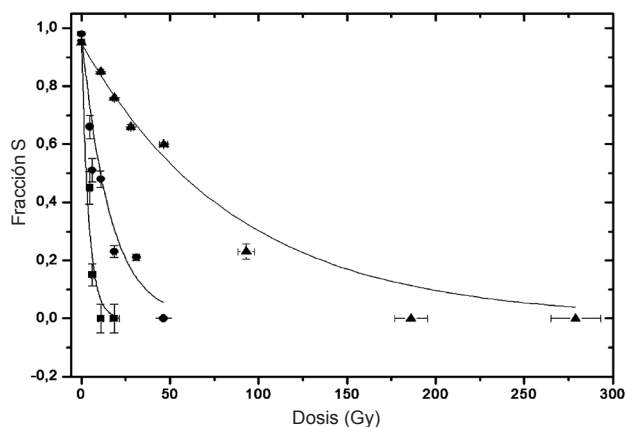


Fig. 3. Ajuste de los porcentajes de la forma superenrollada en función de la dosis para las muestras de 88 ng/μL de disolución de ADN irradiadas con la radiación mixta de neutrones térmicos + rayos gamma. ■ Superenrollada ● Lineal ▲ Circular.

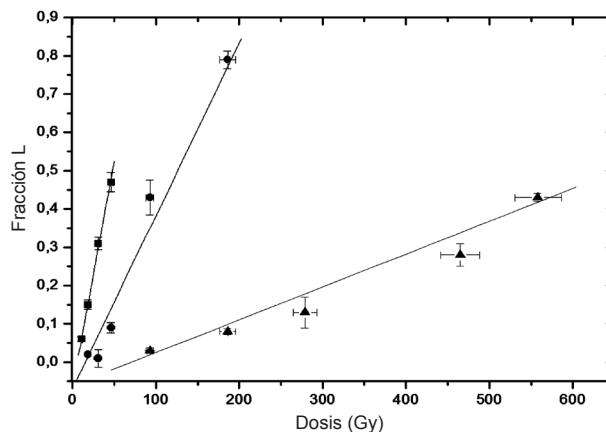


Fig. 4. Ajuste de los porcentajes de la forma lineal en función de la dosis para las muestras de 88 ng/μL de disolución de ADN irradiadas con la radiación mixta de neutrones térmicos + rayos gamma. ■ Superenrollada ● Lineal ▲ Circular.

6. Yokoya A, Shikazono N, Fujii K, Urushibara A, Akamatsu K, Watanabe R. DNA damage induced by the direct effect of radiation, Radiation Physics and Chemistry. 2008; October-December 77(10-12):1280-1285.
7. Śmialek MA, Hoffmann SV, Folkard M, Prise KM, Shuker DEG, Braithwaite NS and Mason NJ. VUV irradiation studies of plasmid DNA in aqueous solution. J Phys Conf Ser. 2008;101.
8. Sharma KKK, Milligan JR and Bernhard WA. Multiplicity of DNA Single-Strand Breaks Produced in pUC18 Exposed to the Direct Effects of Ionizing Radiation. Radiation Research. 2008;170:156-162.
9. Barendsen GW. The relationships between RBE and LET for different types of lethal damage in mammol/Lalian cells: biophysical and molecular mechanism, Radiation Research. 1994;139:257-270.

Tabla 2. G_{DSB} para la muestra de ADN de 88 ng/ μL en función de la concentración de captador de radicales libres irradiada con la radiación mixta de neutrones térmicos + rayos gamma y resultados del ajuste de los porcentajes de la forma superenrollada en función de la dosis.

$C_{\text{Glicerina}}$ (mmol/L)	λ_{DSB} (Gy^{-1})	G_{DSB} ($\text{Gy} \cdot \text{Da}$) ⁻¹	Error (ϵ)	R	N	p	Nivel de confianza (%)
0	0,011 (3,44E-04)	6,16E-09 (1,79E-10)	0,000	0,999	4	0,001	99,9
2	0,004 (3,94E-04)	2,34E-09 (2,05E-10)	0,000	0,988	5	0,001	99,9
20	8,57E-04 (5,59E-05)	4,45E-10 (2,90E-11)	0,000	0,993	5	0,001	99,9

- Peak JG, Ito T, Robb FT and Peak MJ. DNA damage produced by exposure of supercoiled plasmid DNA to high- and low-LET ionizing radiation: Effects of hydroxyl radical quenchers. *Int J Radiat Biol.* 1995;67:1-6.
- Pogozelski WK, Xapsos MA and Blakely WF. Quantitative Assessment of the Contribution of Clustered Damage to DNA Double-Strands Breaks Induced by ⁶⁰Co Gamma Rays and Fission Neutrons, *Radiation Research.* 1999;151:442-448.
- Pang D, Berman BL, Chasovskikh S, Rodgers EJ, Dritschilo A. Investigation of Neutron Induced Damage in DNA by atomic Force Microscopy: Experimental Evidence of Clustered DNA Lesions, *Radiation Research.* 1998;150:612-618.
- Pang D, Rodgers JE, Berman B L, Chasovskikh S and Dritschilo A. Spatial Distribution of Radiation Induced Double-Strand Breaks in Plasmid DNA as Resolved by Atomic Force Microscopy. *Radiation Research.* 2005;164:755-765.
- Spotheim-Maurizot M., M.Charlier and R.Sabattier, DNA radiolysis by fast neutrons, *Int. J.Radiat.Biol.* 1990;57(2): 301-313.
- Kysela BP, Arrand JE and Michael BD. Relative contributions of levels of initial damage and repair of double-strand breaks to the ionizing radiation-sensitive phenotype of the Chinese hamster cell mutant, XR-V15B. Part II. Neutrons, *International Journal of Radiation and Biology.* 1993;64(5): 531-538.
- Stankus AA, Xapsos MA, Kolanko CJ, Gerstenberg HM, and Blakely WF. Energy deposition events produced by fission neutrons in aqueous solutions of plasmid DNA, *Int. J Radiat Biol.* 1995;68(1):1-9.
- Hacker-Klom UB, Kohnlein W and Gohde W. Effects of single and split doses of Cobalts-60 gammarays and 14 MeV neutrons on mouse stem cell spermatogonia, *Radiation Research.* 2000;154:667-672.
- Sèche É, Sabattier R, Bajard J-C, Blondiaux G, Breteau N. Spothem-Maurizot Mélanie, and Charlier Michel, Direct effect in DNA radiolysis in a medical fast-neutron beam, *Radiation Research.* 2002;158:292-301.
- Tsoulou E, Kalfas CA and Sideris EG. Conformational Properties of DNA after Exposure to Gamma Rays and Neutrons, *Radiat Res.* 2005;163:90-97.
- Milligan JR, Aguilera JA, Ward JK. Variation of Single-strand break yield with scavenger concentration for plasmid DNA irradiated in aqueous solution. *Radiation Research.* 1993;133:151-157.
- Xapsos MA and Pogozelski WK. Modelling the yield of double-strand breaks due to formation of multiply damaged sites in irradiated plasmid DNA, *Radiat Research.* 1996;146:668-672.
- Shao C, Yu Z and Saito M. Reaction rate coefficients of hydroxyl radical-induced DNA single- and α -type double-strand breaks, *Radiat Environ Biophys.* 2000;39:121-124.
- Leloup C, Garty G, Assaf G, Cristovao A, Breskin A, Chechik R, Shcemelinin S, Paz-Elizur T, Livneh Z, Schulte RW, Bashkurov V, Milligan R, and Grosswendt B. Evaluation of lesion clustering in irradiated plasmid DNA, *International Journal of Radiation Biology.* 2005;81(1):41-54.
- Siddiqui MA and Bothe E. Single- and Double- Strand Break formation in DNA Irradiated in Aqueous Solution: Dependence on Dose and OH Radical Scavenger Concentration, *Radiat Res.* 1987;112:449-463.
- Cowan R, Collis CHM, and Grigg GW. Breakage of double-stranded DNA due to single-stranded Nicking, *Journal of Theoretical Biology.* 1987;127:229-245.
- Mas Milian F. Estudo *in vitro* dos efeitos radiobiológicos no DNA plasmidial com radiações ionizantes de baixo LET, Tese de doutorado, Instituto de Física, Universidad de São Paulo; 2006.
- Gouveia AN. Estudo quantitativo do efeito da radiação gama sobre DNA em solução aquosa. *Disertação de Mestrado, USP, São Paulo; 2004.*
- Nikjoo H, Uehara S, Emfietzoglou D and Cucinotta FA. Track-structure codes in radiation research, *Radiation Measurements.* 2006; October-November 41(9-10):1052-1074.
- Friedland W, Bernhardt P, Jacob P, Paretzke HG and Dingfelder M. Simulation of DNA damage after proton and low LET irradiation, *Radiat Prot Dosim.* 2002;99(1-4):99-102.
- Wilson WE, Nikjoo H. A Monte Carlo code for Positive Ions Tracks Simulation, *Radiat Environm Biophys.* 2000;38:97-104.
- Semenenko VA and Stewart RD. Fast Monte Carlo simulation of DNA damage formed by electrons and light ions. *Phys Med Biol.* 2006;51(7):1693-1706.
- Uehara S. Monte Carlo Simulation of Water Radiolysis for Low-energy Charged Particles, *J Radiat Res.* 2006;47(1):69-81.
- Champion C, L'Hoir A, Politis MF, Fainstein PD, Rivarolad RD and Chetioui A. A Monte Carlo Code for the Simulation of Heavy-Ion Tracks in Water, *Radiat Res.* 2005;163:222-231.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. *Molecular Cloning: a laboratory manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press: 2001:6,3-6,7.